

## ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНТАКТНОГО ЭНДОТЕЛИЯ ИЗОЛИРОВАННОЙ АОРТЫ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

Яроцкий В.В., Ткаченко М.Н., Марченко С.М.,  
Сагач В.Ф., Костюк П.Г.

*Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев*

### *Введение*

Старение может вызывать изменения в структуре и функции сосудов, которые приводят к определенным патологическим процессам в сердечно-сосудистой системе. В частности, старение сопровождается изменениями в сосудистом эндотелии и гладких мышцах. Известно, что эндотелий играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса. Регуляторная функция эндотелия осуществляется путем продукции и высвобождения различных вазоактивных веществ, обладающих расслабляющим (оксид азота – NO, простациклин, эндотелиальный фактор гиперполяризации) и констрикторным (ангиотензин II, эндотелин, тромбосан A<sub>2</sub>, тромбоцитактивирующий фактор) действием. Существует предположение, что старение может сопровождаться эндотелиальной дисфункцией и изменениями в эндотелийзависимых реакциях, вызванных агентами, стимулирующих продукцию эндотелием оксида азота (ацетилхолин, АТФ, гистамин, брадикинин). Показано, что при старении наблюдается уменьшение продукции NO и угнетение NO-зависимого расслабления сосудистых гладких мышц [4].

Известно, что синтез оксида азота зависит от мембранного потенциала эндотелиальных клеток. В связи с этим представляет интерес изучение влияния старения на электрические реакции агонист-стимулированного эндотелия и мембранного потенциала покоя [5].

Цель работы состояла в исследовании влияния ацетилхолина и аденозинтрифосфата (АТФ) на мембранный потенциал интактного эндотелия изолированной аорты крыс в условиях старения.

### *Материалы и методы исследований*

Для экспериментов использовались самцы крыс линии Вистар-Киото возрастом 24-26 месяцев. Грудную часть аорты нарезали на сегменты длиной 2-3 мм и хранили в модифицированном растворе Кребса следующего состава (мМ/л): NaCl – 118,3; NaHCO<sub>3</sub> – 25; KCl – 4,7; Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O – 1,2; глюкоза – 11,1; гентамицин – 50 мкг/мл. Модифицированный раствор Кребса азиривался смесью воздуха (95%) и CO<sub>2</sub> (5%). Перед экспериментом сегмент аорты разрезали вдоль и фиксировали в камере объемом 100 мкл. Камеру перфузировали раствором Кребса со скоростью 0,6 мл/мин.

Мембранный потенциал измеряли с использованием метода перфорированного patch-clamp в режиме фиксации тока по ранее описанной методике [2,3]. Пипетки заполняли раствором следующего состава (мМ/мл): KCl – 149; NaCl – 10; HEPES-KOH – 10 (pH-7,3). Эксперименты проводили при температуре 20 – 24 °С.

### *Результаты и их обсуждение*

В первую очередь был исследован мембранный потенциал нестимулированного эндотелия интактной аорты старых крыс. Оказалось, что для мембранного потенциала покоя характерны значения от –46 мВ до –15 мВ. Распределение значений мембранного потенциала было одномодовым. Среднее значение мембранного потенциала покоя  $-28 \pm 9$  мВ ( $n=23$ ). Для разных регистраций значений мембранного потенциала эндотелия от одной сосудистой полоски характерен разброс значений до 10 мВ, что существенно отличается от результатов аналогичных экспериментов проведенных на интактном эндотелии изолированной аорты молодых крыс [2]. В нашем случае значения мембранного потенциала покоя оказались существенно выше.

Для исследований влияния агонистов на мембранный потенциал интактного эндотелия использовали ацетилхолин в концентрации 1 мкмоль/л и АТФ в концентрации 100 мкмоль/л. Экспериментальные результаты показали, что аппликация ацетилхолина вызывала сложную реакцию. Первичной фазой ответа эндотелия на ацетилхолин была быстрая гиперполяризация ( $n=12$ ), которая могла достигать до 40 мВ и в среднем составляла  $27 \pm 9$  мВ. Следующие фазы ответов имели существенные отличия. Согласно этим различиям можно условно выделить три группы результатов. В первой группе ( $n=6$ ) наблюдали развитие длительной гиперполяризации. Во второй группе ( $n=3$ ) после быстрой гиперполяризации развивалась деполяризация ниже значения мембранного потенциала покоя. В третьей группе ( $n=5$ ) после быстрой гиперполяризации наблюдалась существенная деполяризация выше мембранного потенциала покоя.

Подобно ацетилхолину, АТФ первоначально вызывал быструю гиперполяризацию интактного эндотелия ( $n=12$ ) после которой развивалась медленная деполяризация. Хотя направление реакций были одинаковым во всех наблюдаемых случаях, то есть, быстрая гиперполяризация сменялась деполяризацией, но амплитуды и кинетика сильно отличались от одной регистрации к другой.

Следует особо отметить, что наблюдаемые отличия в электрических реакциях интактного эндотелия на ацетилхолин и АТФ были характерны даже для разных регистраций от одной сосудистой полоски. В частности, на одном препарате наблюдались все три группы реакций на ацетилхолин. Эти результаты существенно отличаются от описанных в

литературе реакций мембранного потенциала интактного эндотелия молодых крыс [2,3] и кроликов [1], для которых были характерны однотипные ответы.

Полученные результаты позволяют считать, что эндотелий у старых животных изменяет свои характеристики, что сопровождается его дисфункцией. В наших экспериментах это отражается в нарушении однотипности ответов мембранного потенциала на ацетилхолин и АТФ, а также существенное повышение мембранного потенциала покоя. Действительно, для молодых животных характерна пространственно-временная синхронизация электрической и кальциевой сигнализации [6]. Эта особенность эндотелия обусловлена эндотелий-эндотелиальными контактами. Исходя из этого, можно предположить, что эндотелий аорты у старых животных либо теряет значительную часть этих контактов, либо эндотелиальные клетки частично вымываются, образуя таким образом только кластеры, то есть эндотелий уже не представляет собой сплошного слоя, выстилающего внутреннюю сторону сосуда. В качестве дополнительного аргумента можно считать то, что для электрически несоединенных эндотелиальных клеток мембранный потенциал покоя выше, чем для эндотелиальных клеток, имеющих такие контакты [5].

Работа выполнена при поддержке ГФФИ Украины (проект 05.07/00159).

#### *Литература*

1. Яроцкий В.В., Сагач В.Ф., Марченко С.М. Електричні властивості інтактного ендотелію аорти кроля // Фізіол. журн. – 2001. – 47, № 1. – С. 9-16.
2. Marchenko S.M., Sage S.O. Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta // J. Physiol. – 1993. – V. 462. – P. 735-751
3. Marchenko S.M., Sage S.O. Mechanism of acetylcholine action on membrane potential of endothelium of intact rat aorta // Am. J. Physiol. – 1994. – V. 266. – H2388-2395.
4. Marin J., Rodrigues-Martinez M.A. Age-related changes in vascular responses // Exp. Gerontol. – 1999. – V. 34. – P. 503-512.
5. Nilius B., Viana F., Droogmans G. Ion channels in vascular endothelium // Annu. Rev. Physiol. – 1997. – V. 59. – P. 145-170.
6. Usachev Y.M., Marchenko S.M., Sage S.O. Cytosolic calcium concentration in resting and stimulated endothelium of excised intact rat aorta // J. Physiol. – 1995. – V. 489. – P. 309-317.